

Especificidad de los alteradores endocrinos en la expresión génica durante el desarrollo

Miguel A. Briño-Enríquez, Jesús García-López, Jesús del Mazo

Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)
jdelmazo@cib.csic.es

Los efectos adversos de los contaminantes ambientales sobre la salud reproductiva están bien documentados¹. Numerosas publicaciones indican una relación causal entre la alteración endocrina por productos químicos contaminantes medioambientales y el riesgo de sufrir patologías tales como infertilidad y cáncer. Los alteradores endocrinos (DE) puede alterar la homeostasis de los organismos vivos modificando el equilibrio hormonal y alterando los patrones normales de regulación génica durante el desarrollo y la diferenciación celular. Consecuentemente, tanto el desarrollo gonadal como su funcionalidad puede ser afectada por la exposición a DE específicos o sus mezclas. Los mecanismos moleculares implicados en la acción de estos reprotóxicos son complejos y no están bien caracterizados. Estos compuestos pueden alterar la interacción entre los mecanismos de regulación génica en redes funcionales a nivel celular y sistémico, especialmente durante momentos críticos del desarrollo embrionario². Recientes estudios, señalan efectos transgeneracionales causados por la exposición a DE por medio de mecanismos epigenéticos.

El desarrollo y la función testicular han sido identificados claramente como diana importante en la acción de los DE. Un clásico, aunque controvertido estudio³ señala la disminución global, en los últimos cincuenta años, de la calidad espermática humana. A ello parece asociarse otras entidades patológicas relacionadas en el denominado "Síndrome de Disgenesia Testicular" definido por el grupo de Niels Skakkebaek, como son: hipospadias, criptorquidia, recuentos bajos de espermatozoides y tumores testiculares⁴.

El desarrollo testicular y la espermatogénesis implican complejos procesos de proliferación, diferenciación, interacciones celulares y cambios morfogénicos para generar células altamente diferenciadas y haploides, como son los espermatozoides. El carácter exclusivo de algunos de estos procesos requiere un control coordinado y complejo de expresión génica. Aunque con diferencias temporales, los rasgos básicos y la diferenciación espermatogénica tanto a nivel celular y molecular, así como la progresión del desarrollo, son similares entre los mamíferos, incluyendo humanos. Ello permite hacer predicciones sobre patología humana usando modelos

animales. Se ha estimado que aproximadamente el 4 % del genoma del ratón, lo que representa por encima de 2300 genes, se expresa específicamente en testículo (Schultz et al., 2003). A ello hay que añadir las múltiples formas alternativas de regulación post-transcripcional de mRNAs muy frecuentes en espermatogénesis así como nuevas y complejas vías de regulación postranscripcional mediada por microRNAs^{5,6}.

La funcionalidad gonadal en el adulto viene condicionada por el correcto desarrollo y diferenciación durante la embriogénesis, tanto de las células germinales como de las somáticas que conforman la gónada. Durante los primeros estadios de la embriogénesis señales hormonales y genéticas determinan el destino y la diferenciación sexual de las gónadas. En mamíferos, las células primordiales germinales (primordial germ cells, PGC) son los precursores embrionarios de las células germinales femeninas y masculinas. Su determinación celular se produce en ratón a los 6,5 días postfertilización, y alrededor de la tercera semana de gestación en humanos^{7,8}. Las PGC migran dentro de las crestas gonadales en desarrollo donde se diferencian en células germinales masculinas o femeninas, posteriormente a la proliferación, entran en quiescencia en el primer caso y en meiosis en el segundo. Obviamente, cambios en el complejo patrón de expresión génica, capaces de controlar estos procesos, conllevan alteraciones funcionales de la gónada. Claros ejemplos del posible origen embrionario de patologías gonadales son algunos tipos de tumores testiculares de células germinales^{9,10}. La similitud entre los patrones de expresión génica de las PGC y las células neoplásicas de tumores testiculares son indicadores del posible origen fetal de los tipos más frecuentes de tumores de testículo detectados¹¹. En consecuencia, algunas alteraciones de los patrones normales de la expresión de genes claves en la diferenciación de PGC pueden ser inducidos por elementos exógenos, como los DE. La acción de los DE en estos periodos críticos del desarrollo, provocan desequilibrios latentes capaces de manifestarse en la vida adulta. Así pues, la existencia de periodos de alto riesgo durante el desarrollo, desregulación génica inducida y manifestación en células y tejidos diana, son características que encajan con los efectos ampliamente planteados de los DE.

El análisis de alteraciones del transcriptoma por la exposición a DE se ha llevado a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de ratón. Así, la desregulación de AKT, una quinasa crítica en la proliferación de PGC, fue detectada en ensayos *in vitro* de PGC expuestos tanto a lindano¹² como a estradiol¹³. Igualmente, mediante genotecas de cDNA y análisis de expresión diferencial en PGC expuestas *in vitro* a algunos reprotóxicos, incluyendo DE, pudimos comprobar que la mayoría de los genes desregulados codifican proteínas implicadas en vías básicas para la supervivencia celular: cadena respiratoria, el estrés oxidativo, proteínas ribosómicas, metabolismo celular y factores de traducción¹⁰.

Múltiples trabajos han descrito la desregulación de la expresión de genes específicos en testículo como consecuencia de la exposición a DE. Sin embargo, el uso de microarrays y secuenciación masiva de RNA están dando una visión más global del efecto a nivel transcripcional de estos compuestos, su relación con dosis y estadios del desarrollo durante su exposición. Así, tras suministrar vinclozolina, un conocido pesticida con efectos antiandrogénicos, a madres gestantes (13-16 días de gestación) se detectó una desregulación de la expresión de más de 500 genes¹⁴. Recientemente, nosotros hemos llevado a cabo un estudio comparativo en modelos murinos del efecto de diferentes DEs sobre la expresión génica en el desarrollo testicular, evaluando tipo de compuesto, dosis y diferentes períodos de desarrollo de la exposición¹⁵. Analizamos para ello cinco compuestos considerados como DE: 17 beta-estradiol (E2), como un estrógeno natural; lindano, como uno de los pesticidas sintéticos más antiguos; mono-(2-etilhexil) ftalato de (MEHP) como metabolito activo del DEHP, el conocido bisfenol A (BPA) y zearalenona (ZEA) una micotoxina estrogénica no esteroidea. En la exposición por vía oral se incluyeron tres tipos de exposición: i) en el primero de los grupos de estudio las madres se expusieron dos semanas antes del apareamiento, ii) en el segundo grupo se suministraron los compuestos también durante el embarazo y iii) tras el parto, el último de los grupos de estudio estaba compuesto por las crías de las madres tratadas; dichas crías fueron expuestas cuatro semanas más a partir de su nacimiento. Se incluyeron en el estudio tres dosis diferentes para cada compuesto. Lo que implica el análisis conjunto de 45 condiciones diferentes. Sobre el análisis de todo el transcriptoma de ratón (correspondiente a 24 878 genes) pudimos detectar en testículo de animales adultos la desregulación de al menos 2670 genes. Entre las redes funcionales de interacción génica detectamos como las más relevantes aquellas implicadas en: cáncer, desarrollo y trastornos del sistema endocrino. Si bien los patrones de desregulación fueron diferentes para

distintos ED, dos compuestos: MEHP y ZEA, mostraron patrones de desregulación génica específica. Tales patrones eran independientes de la concentración de la sustancia tóxica o el período de desarrollo durante el cual ocurrió la exposición. Estos resultados sugieren que los mecanismos de acción a nivel de la desregulación de la expresión génica se produjeron en las primeras etapas de desarrollo. Es más, el grupo experimental de ratones en los que solo fue expuesta la madre, en un periodo anterior a la fecundación, presentaba patrones de desregulación equivalentes a los observados en los animales cuya exposición había sido más prolongada. La acumulación materna de los DE y/o efectos epigenéticos podrían explicar el patrón de expresión génica alterado que se observa en los testículos de los animales adultos.


En ese sentido, actualmente estamos llevando a cabo el desarrollo experimental del efecto transgeneracional de DEs, como la vinclozolina, en los que ya previamente se había detectado un efecto fenotípico transgeneracional mediado por modificaciones epigenéticas^{16,17}. Nuestro trabajo se está centrando tanto en la desregulación de genes específicos implicados en el desarrollo y diferenciación de células germinales en etapas embrionarias y su expresión en testículo adulto, como en reguladores negativos postranscripcionales tales como los microRNAs. Estudios recientes indican de que dos conocidos DE como son el DDT y el BPA alteran el patrón de expresión de múltiples miRNAs en líneas celulares humanas, incluyendo *hsa-miR-21*, regulado por estrógenos y considerado como onco-miR en el cáncer de mama¹⁸. El análisis en tres generaciones del efecto de vinclozolina se discutirá también como presentación específica.

FINANCIACIÓN

Los estudios de genes y los efectos de los alteradores endocrinos sobre la expresión génica llevados a cabo en el laboratorio de J. del Mazo han sido llevados a cabo en proyectos financiados parcialmente por: EC (QLK4-CT-2002-02403), CEFIC-LRI; MEDDTL (11-MRES-PNRPE-9-CVS -072) Francia, y CSIC (PIE 201020E016), España.

REFERENCIAS

1. Woodruff TJ, Carlson A, Schwartz JM, Giudice LC. Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary. *Fertil. Steril.* 2008;89:281-300.
2. Edwards TM, Myers JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ. Health Perspect.* 2007;115:1264-70.
3. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillelte LJ, Jr., Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H,

- 
- McLachlan JA et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 4:741-803.
 4. Asklund C, Jorgensen N, Kold Jensen T, Skakkebaek NE. Biology and epidemiology of testicular dysgenesis syndrome. *BJU Int.* 2004; 93 Suppl 3:6-11.
 5. Gonzalez-Gonzalez E, Lopez-Casas PP, del Mazo J. The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. *Biochim. Biophys. Acta* 2008;1779:306-11.
 6. Garcia-Lopez J, del Mazo J. Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1819:847-54.
 7. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 2003;262:1-15.
 8. De Felici M. Origin, migration and proliferation of human primordial germ cells. In: Goticchio G (ed.) *Oogenesis*. London: Springer-Verlag; 2012.
 9. Kristensen DM, Sonne SB, Ottesen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H, Meyts ER. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol. Cell Endocrinol.* 2008;288:111-8.
 10. del Mazo J, Brieño-Enriquez MA, García-López J, López-Fernández LA, De Felici M. Endocrine disruptors, gene deregulation and male germ cell tumors. *Int. J. Dev. Biol.* 2013; 10.1387/ijdb.130042jd.
 11. Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res.* 2004;64:4736-43.
 12. La Sala G, Farini D, De Felici M. Proapoptotic effects of lindane on mouse primordial germ cells. *Toxicol. Sci.* 2009;108:445-51.
 13. La Sala G, Farini D, De Felici M. Rapid estrogen signalling in mouse primordial germ cells. *Exp. Cell. Res.* 2010;316:1716-1727.
 14. Clement TM, Savenkova MI, Settles M, Anway MD, Skinner MK. Alterations in the developing testis transcriptome following embryonic vinclozolin exposure. *Reprod. Toxicol.* 2010;30:353-364.
 15. Lopez-Casas PP, Mizrak SC, Lopez-Fernandez LA, Paz M, de Rooij DG, Del Mazo J. The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reprod. Toxicol.* 2012; 33:106-15.
 16. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308:1466-69.
 17. Anway MD, Leathers C, Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 2006; 147:5515-23.
 18. Tilghman SL, Bratton MR, Segar HC, Martin EC, Rhodes LV, Li M, McLachlan JA, Wiese TE, Nephew KP, Burow ME. Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells. *PLoS ONE* 2012; 7:e32754.